

553, 601

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/094587 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12M 1/42, C12N 13/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005818
- (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-116895 2003 年 4 月 22 日 (22.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾崎 美和子 (OZAKI, Miwako) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 伊藤 康一 (ITO, Koichi) [JP/JP]; 〒1760002 東京都練馬区桜台 1 丁目 3 8 番 1 号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL STIMULATING DEVICE AND CELL STIMULATING METHOD

(54) 発明の名称: 細胞刺激装置及び細胞刺激方法

(57) Abstract: An electrical stimulating device for directly giving an electrical stimulus to a great many nerve cells outside the organism efficiently without damaging the cells. The device is characterized in that it comprises a first positive or negative electrode that extends from one side of a culture vessel in which culture cells are placed to the distance where the electrode is out of contact with the culture cells or in contact therewith and a second positive or negative electrode that extends from the other side of the culture vessel to the distance where the electrode is out of contact with the culture cells or in contact therewith, and in that an electric field for stimulating the cells is produced by the first and second electrodes.

(57) 要約: 本発明の目的は、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えるための電気刺激装置を提供することである。本発明によれば、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、細胞刺激装置が提供される。

WO 2004/094587 A1

## 明細書

## 細胞刺激装置及び細胞刺激方法

## 技術分野

本発明は、細胞刺激装置及び細胞刺激方法に関するものである。より詳細には、本発明は、培養細胞に非接触又は表面に軽く接触する程度の状態で該培養細胞に電氣的刺激を与えることができる細胞刺激装置及び細胞刺激方法に関するものである。

## 背景技術

神経細胞の特徴の一つは、細胞自体が神経活動と呼ばれる電氣的な活動を有することである。未熟な神経細胞が分化・発達していく過程において、神経細胞は神経伝達物質や神経栄養因子などの刺激に反応してイオンチャンネルや伝達物質受容体などを発現し、神経細胞固有の伝達物質感受性や興奮性（固有の神経活動）を獲得していき、そのパターンが神経細胞の個々の歴史や個性を表現していると考えられる。また、近年ではこの神経活動、即ち電氣的な刺激が逆に神経に関連する物質の動態を制御していることも明らかとなってきた。

本発明者らはこれまで、神経活動とその生物学的役割を明らかにするために研究を行ってきた。その結果、神経活動のパターン（電氣的活動のパターン）が情報コードシステムとして働いている可能性があることが明らかになってきた。本発明者らの研究の最終的な目標は、神経活動のパターンを制御することにより脳の可塑性を制御することであるが、そのために重要なことは、神経活動（神経インパルス）のパターンの持つ役割を明らかにし、神経活動のパターンを解読し、神経活動のパターンのプロファイリングを行うことである。そのためには、人為的によくコントロールされた刺激条件下で実験を行うことが必要であった。

また、神経細胞の電氣的な活動を制御することにより、脳の可塑性を制御し、治療に応用することも可能である。再生医療においても、特に神経の再生におい

ては、神経細胞の電氣的な活動を持たせることが正常な機能を獲得する上で必須と考えられている。そのためには、生体外で効率よく大量の神経細胞に細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えるための電気刺激装置が必須であった。

細胞に電気刺激を与えるための従来の方法としては、(1)電極を神経細胞に挿入することにより刺激する方法、または(2)刺激用電極基盤上に神経細胞を接着させることにより刺激する方法が知られている。しかし、上記(1)の方法では、一度に多数の細胞を刺激することが困難であり、また細胞へのダメージも大きいという欠点がある。また、上記(2)の方法では、電極基盤上に接着できる神経細胞は極めて少なく、実用的な刺激装置として機能させることは困難であるという欠点がある。

#### 発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えるための電気刺激装置を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えることができる細胞刺激方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備えた細胞刺激を用いて、前記第一の電極と前記第二の電極とにより電場を形成して、該電場により細胞を刺激することにより、細胞に所望の電氣的刺激を与えることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養

細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、細胞刺激装置が提供される。

好ましくは、培養細胞を入れるための培養容器の上面又は側面の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の上面又は側面の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、上記の細胞刺激装置が提供される。

好ましくは、前記第一の電極は、円形のリング電極である。

好ましくは、前記第二の電極は、一本の点電極であるか、複数の多点電極であるか、メッシュ状のシート状電極であるか、あるいは多点電極を含むシート状電極である。

本発明の別の側面によれば、前記の何れかの細胞刺激装置を用いて、前記第一の電極と前記第二の電極とにより電場を形成し、該電場により培養細胞を刺激することを特徴とする、細胞の電氣的刺激方法が提供される。

好ましくは、本発明の細胞の電氣的刺激方法で刺激する培養細胞は神経細胞である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、第一の電極が円形のリング電極（小型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。

図2は、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。

図3は、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が複数の

多点電極である場合の細胞刺激装置を示す。

図4は、第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極がメッシュ状のシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。

図5は、第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極が多点電極を含むシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。

図1～5において、1は正（又は負）の電極、2は負（又は正）の電極、3は配線、4は培養容器本体、5は培養容器蓋部、6は細胞、7は電源を示す。

図6は、PMA刺激によるニューレグリンのタンパク質分断を示す。

脳橋核ニューロン及び小脳顆粒細胞を7DIV（days in vitro）で抗NRG $\beta$ 1抗体で染色した。両ニューロンで、細胞体及びニューロン性プロセスはNRG陽性であった（図A）。スケールバー；60 $\mu$ m

図Bでは、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞を、膜貫通型のNRGをトランスフェクションしたものとししないものについて調製し、PMAで60分間刺激し、条件培地を回収した。条件培地のチロシンリン酸化活性を小脳顆粒細胞を用いて調べた。顆粒細胞培養物を、回収・濃縮した条件培地で5～10分間刺激した。顆粒細胞からのライセートをSDS-PAGEで分解し、プロットを抗-ErbB4抗体で免疫沈降した後、抗ホスホチロシン抗体（4G10）で検出した。180kDのチロシンリン酸化したバンドを刺激により検出した（図B）。条件培地をPN（トランスフェクションしない脳橋核ニューロン）、tPN（トランスフェクションした脳橋核ニューロン）、GC（トランスフェクションしない顆粒細胞）、及びtGC（トランスフェクションした顆粒細胞）から回収した。結果を図Cに要約する。実験は独立に3又は4回繰り返した。

図Dでは、小脳顆粒細胞を用いて、条件培地刺激後のCREB-リン酸化を確かめた。血清飢餓小脳顆粒細胞を、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞培養物から回収した条件培地で処理した（5～10分間）。脳橋核ニューロンからの条件培地をa、b及びcにおいて刺激のために使用した。d、e及びfでは、条件培地を顆粒細胞培養物から調製した。

a、d : 対照

b、e : ベクター (pEGFP-N3)

c、f : pNRG-GFP

刺激した顆粒細胞は、固定化後、ホスホ-CREB 抗体で染色した。PMA 刺激 (60 分間) により放出された可溶型を濃縮し、培養顆粒細胞に加えた。条件培地は、パネル c 及び f において内生の NRG 及び組み換え NRG を含むはずである。b 及び e からの差し引きは、組み換え mNRG から切断された NRG の作用を示した。ErbB 及び CREB リン酸化アッセイ系を使用して、E 及び F においてタンパク質分解に必要なアミノ酸配列を同定した。ELYQKRVL T 配列は膜貫通ドメインの細胞外並列の上に位置していた。配列を欠失またはリジンからグリシンに変異させた場合、タンパク質分解の効率は F に示す通り阻害された。リジン残基はプロテアーゼによる認識に必須のアミノ酸であった。

図 7 は、電気刺激による CREB-リン酸化活性を示す。

脳橋ニューロン及び小脳顆粒細胞を 18 日齢の胎児マウス及び生後 7 日のマウスからそれぞれ調製した。ニューロンを 7 日間培養し、異なるパターンの電気刺激で刺激した。電気刺激後、CREB-リン酸化を顆粒細胞を用いて調べた (図 A 及び B)。抗 PCREB 抗体に陽性の細胞を計数し、全細胞数に対して標準化した。各皿からランダムな 5 箇所顕微鏡視野 (20 倍) を細胞計数のために撮影した。独立した実験から、3 ~ 5 枚の皿を計数した。CREB リン酸化の効率は 50 Hz 刺激で最高であった。リン酸化は TTX により部分的にブロックされた。

図 8 は、電気刺激による NRG のタンパク質分断を示す。

電気刺激後、ErbB4 のチロシンリン酸化活性を PMA 刺激により同一の方法で測定した。パネル A は、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞においては、ErbB4 に対する条件培地のチロシン-リン酸化活性の効率が 50 Hz の刺激で最高あることを示す。チロシンリン酸化は PKC 阻害剤である H7 によりブロックされた。結果をグラフに要約する (図 B)。図 C 及び D では、小脳顆粒細胞を用いて条件培地刺激による刺激後に、CREB リン酸化を確認した。血清飢餓小脳顆粒細胞を、電気

刺激後の顆粒細胞培養物から回収した条件培地で試験した（15分間）。

Full-NRG: これらの実験では、全長 NRG を顆粒細胞にトランスフェクションした。

Del-NRG: NRG のアミノ酸番号 197～216 を欠失させ、タンパク質はタンパク質分解に耐性である。

最後に、免疫沈降後のイムノブロットにより切断された NRG を直接検出した結果を G に示す。検出の手法を図 E 及び F に要約する。mNRG を電気刺激後にトランスフェクションした（トランスフェクション効率；～5%）約  $5 \times 10^7$  個の顆粒細胞から、条件培地を回収した。培地をセントリコンを用いて濃縮し、抗-sNRG 抗体で免疫沈降した。抗体としては、切断型 NRG の c 末端のみを認識する抗 sNRG ポリクローナル抗体（実施例 1 で作成した抗体）を使用した。免疫沈降後に、NRG  $\beta$  1 のみを認識する抗 NRG  $\beta$  1 抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。図 G に示す通り、50 Hz の刺激で切断型 NRG のシグナルが検出できた。このシグナルは PKC 阻害剤である H7 により消失した。これらの結果から、培地中に放出された NRG 量は周波数の刺激に応じて異なることが分かる。

図 9 は、リアルタイム定量 PCR 法により定量した NMDA 及び GABAA 受容体サブユニット発現を示す。

図 A では、インビトロで 1～21 日間 10 mM の KCl を用いて培養した顆粒細胞を用いて、NMDA 及び GABAA 受容体サブユニット発現を調べた。電気刺激実験のために 7 DIV（days in vitro）を選択した。7 DIV では、顆粒細胞は未だ生きているが、NMDA 受容体、NR2C、2B 及び GABAA 受容体  $\beta$  2 サブユニット mRNA は減少している。GABAA 受容体  $\alpha$  1 及び  $\gamma$  2 mRNA は 7 DIV では保持されていた。異なるパターンの電気刺激後に RT-PCR のリアルタイム定量分析を行った。NR2C 及び  $\beta$  2 サブユニットの転写を異なる周波数で制御した。NR2C 転写は、1.0 及び 100 Hz の刺激で促進され（図 B）、100 Hz で検出された増加は TTX 処理でブロックされた。しかし、1.0 Hz での増加は TTX では強くはブロックされなかった。一方、 $\beta$  2 転写

は、0.1～10 Hz の刺激で NR2C よりも強く促進され、増加は TTX 処理でブロックされた。100 Hz での増加は TTX で部分的にブロックされた。0.1 Hz ; n=6、1 Hz ; n=18、10 Hz ; n=10、50 Hz ; n=12、100 Hz ; n=26、TTX で非刺激 ; n=3、1 Hz 及び TTX ; n=6、100 Hz & TTX ; n=6、\* p<0.001、\*\* p<0.00001

図 C では薬理実験を電気刺激の下で行った。NR2C の場合、1 及び 100 Hz で増加した転写は全てのアンタゴニスト及びブロッカーにより部分的にブロックされた。しかしながら、MK801 は NR2C mRNA 発現を強くブロックした。β2 の場合、MK801 に加えて CNQX は 1.0 及び 100 Hz の刺激で転写をブロックした。100 Hz での mRNA の増加は非特異的カルシウムブロッカーにより強く阻害されたが、1.0 Hz での増加は明らかにブロックされなかった。何れの場合も、直接的電気刺激は、少なくとも基底レベルまで受容体の活性化を部分的に模倣できた。AP5 ; 競合 NMDA 受容体アンタゴニスト、MK801 ; 非競合 NMDA 受容体アンタゴニスト、CNQX ; AMPA 受容体アンタゴニスト、Cd & EGTA ; 非特異的カルシウムチャンネルブロッカー。各実験は独立に 3～8 回繰り返した。

図 10 は、周波数依存形式で制御された NMDA 及び GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニット発現の模式図を示す。

小脳顆粒細胞は、苔状線維から興奮シグナルを、そしてゴルジ体から GABA<sub>A</sub> 受容体を介して阻害シグナルを受ける。これらの活性の組み合わせが、ニューロン活性のパターンを決定する。苔状線維によって刺激されない顆粒細胞でも自発的活性を有する。比較的低い周波数において、NR2C 及び β2 サブユニット発現は共に検出されたが、β2 発現は NR2C よりも促進された (I)。一方、NR2C 発現は、100 Hz のような高周波数でより強く誘導された。NR2C の発現は苔状線維刺激顆粒細胞で誘導される可能性があり、相当量の受容体活性化に関与している (III)。

図 11 は、受容体活性化のモデル及びニューロン活性のパターンを示す。



### 発明を実施するための最良の形態

本発明の細胞刺激装置は、培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とするものである。

上記した第一の電極及び第二の電極はそれぞれ正又は負の電極を構成し、両者を組み合わせて使用することにより、細胞を刺激するための電場が形成される。上記した第一の電極及び第二の電極はそれぞれ培養容器の上面又は側面から培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びるように設置されている。

本発明の一例では、第一の電極は円形のリング電極とし、第二の電極を一本の点電極、複数の多点電極、メッシュ状のシート状電極、あるいは多点電極を含むシート状電極とすることができる。以下、上記したような本発明の各種の実施の形態を図面に基づいて説明する。

図1は、本発明の第一の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極（小型）であり、第二の電極が一本の点電極である場合の細胞刺激装置を示す。図1の上段の図は側面図を示し、中段の図は斜視図を示し、それぞれ、正（又は負）の電極1（一本の点電極）と負（又は正）の電極2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部5の異なる位置から配線3により電源7に接続された状態で、培養容器本体4の底面上で培養している細胞6の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極1と電極2は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図1の下段の図は、上面から見た電極1と電極2の位置関係を示す。

図2は、本発明の第二の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が一本の点電極であ

る場合の細胞刺激装置を示す。図 2 の上段の図は側面図を示し、正（又は負）の電極 1（一本の点電極）と負（又は正）の電極 2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部 5 の異なる位置から配線 3 により電源 7 に接続された状態で、培養容器本体 4 の底面上で培養している細胞 6 の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極 1 と電極 2 は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図 2 の下段の図は、上面から見た電極 1 と電極 2 の位置関係を示す。

図 3 は、本発明の第三の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極（大型）であり、第二の電極が複数の多点電極である場合の細胞刺激装置を示す。図 3 の上段の図は側面図を示し、正（又は負）の複数の多点電極 1 と負（又は正）の電極 2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部 5 の異なる位置から配線 3 により電源 7 に接続された状態で、培養容器本体 4 の底面上で培養している細胞 6 の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極 1 と電極 2 は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図 3 の下段の図は、上面から見た電極 1 と電極 2 の位置関係を示す。

図 4 は、本発明の第四の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極がメッシュ状のシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。図 4 の上段の図は側面図を示し、正（又は負）の電極 1（メッシュ状のシート状電極）と負（又は正）の電極 2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部 5 から配線 3 により電源 7 に接続された状態で、培養容器本体 4 の底面上で培養している細胞 6 の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極 1 と電極 2 は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図 4 の下段の図は、上面から見た電極 1 と電極 2 の位置関係を示す。第二の電極 1 においては、メッシュ状に形成された電極 2 が、全体としてはシートを形成している。

図 5 は、本発明の第五の態様の細胞刺激装置を示すものであり、具体的には、

第一の電極が円形のリング電極であり、第二の電極が多点電極を含むシート状電極である場合の細胞刺激装置を示す。図5の上段の図は側面図を示し、正（又は負）の電極1（多点電極を含むシート状電極）と負（又は正）の電極2（円形のリング電極）とが、培養容器蓋部5から配線3により電源7に接続された状態で、培養容器本体4の底面上で培養している細胞6の表面に接触する地点まで延びている状態を示す。なお、電極1と電極2は片方が正の電極の場合は、他方が負の電極になるように選択される。図5の下段の図は、上面から見た電極1と電極2の位置関係を示す。第二の電極2においては、多数の電極（多点電極）1が全体としてはシートを形成している。

図1～図5に構造を示す本発明の細胞刺激装置においては、培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正と負の電極の組み合わせにより培養容器中の培地内に電場を形成し、この電場により細胞を電氣的に刺激することができる。本発明においては、刺激する細胞の種類や性質、形成する電場の強さ、並びに電場を形成する領域などに応じて、上記した図1～図5に記載した構造を有する細胞刺激装置の中から最も適したものを適宜選択して使用することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に示すが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### 実施例1：分泌型ニューレグリンを特異的に認識する抗体の作製

#### （1）抗原ハプテンペプチドの設計

タンパク質の限定分解反応を補足する抗ペプチド抗体を調製するためには、標的とする基質タンパク質の切断部位に関する情報が必要である。本実施例では分泌型ニューレグリンのC末端を含む短いペプチド（5merあるいは6mer）にシステイン残基を付加したペプチドを合成し、ハプテンとして用いた。具体的には、Cys-Glu-Leu-Tyr-Gln及びCys-Glu-Leu-Tyr-Gln-Lysの混合ペプチドを抗原とし

て用いた。

(2) 用いた試薬

- ・合成ハプテンペプチド
- ・KLH(keyhole limpet hemocyanin) in 50% グリセロール (約 80mg/ml)  
[Calibiochem 社]
- ・DMFA (ジメチルホルムアルデヒド)
- ・MBS (m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)  
[Pierce 社]
- ・ゲル濾過カラム (ファルマシア PD-10)
- ・50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5)
- ・100mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.2)

免疫

- ・フロイント完全アジュバント (FCA)
- ・フロイント不完全アジュバント (FIA)
- ・シリンジ・注射針など

抗体のアフィニティー精製

- ・100mM HEPES バッファー (pH7.5)
- ・Affigel 10 または 15 [バイオラッド社]
- ・30%酢酸
- ・20%エタノール
- ・PBS
- ・50mM クエン酸バッファー (pH3.0)
- ・2M トリスバッファー (pH9.5)
- ・20%グリセロール含 Na-PBS

(3) 抗原(ハプテン/キャリア複合体)の調製

① MBS/活性化 KLH を調製する。KLH 約 40mg (0.5ml) を 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) 1.5ml に加え、スターラーを用いて攪拌する。次に、9.3mg の

MBS を 0.38ml の DMFA に溶解したものを (用時調製)、これに加える。MBS 添加後、室温で 30 分攪拌する。その後、2,000rpm で 2 分程度遠心し、上清を以下で用いた。

② MBS/活性化 KLH をフリーの MBS から分離する。ファルマシア PD-10 カラムを 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) 40~50ml で洗浄し、平衡化しておく。これに①の遠心上清 2ml を添加し、ゲルに浸潤した後に 0.5ml のバッファーを加える。浸潤し終わった時点で溶出液の回収を始め (最初の 2.5ml を prevoid として捨てる)、2ml の溶出液 (MBS/活性化 KLH) を回収する。これで 4 回分のカップリングに使用することのできる標品が得られる。

③ 合成ハプテンペプチドを活性化 KLH にカップリングする。合成ペプチド 5mg 程度を 4.5ml の 100mM リン酸 Na バッファー (pH7.2) に溶解し、攪拌する。この際、pH 試験紙を用いて溶液の pH が下がっていないことを確認する。これに、0.5ml の MBS/活性化 KLH を加え、4℃で一昼夜攪拌する。その後、透析する必要はない。これを免疫原として使用する。保存は -20℃または -80℃で行う。

#### (4) 免疫

① ウサギを用いてポリクローナル抗体を調製した。まず、体重約 3kg のウサギに対して 1 次免疫を行う。抗原溶液 0.3ml に対して 0.6ml の FCA を加え、攪拌後、超音波処理 [Branson Sonifier 185 (bath type)、power 7~10、3 分程度] によってエマルジョンを調製する。これを、左右の背筋上に位置する皮下部分に 10ヶ所程度に分けて注射する。注射針は 18G あるいは 21G を用いる。

② 約 1 ヶ月後に 2 次免疫を行う。この場合は、0.3ml の抗原溶液に対して 0.6ml の FLA を用いて、同様にエマルジョンを調製する。左右の大腿筋に注射する。

③ 2 次免疫の 2 週間後と 4 週間後に、3 次免疫及び 4 次免疫を行う。この場合は、0.15ml の抗原溶液を 0.45ml の PBS で希釈し、①と同様に背中に皮下注射を行う。用いる注射針は 26G でよい。

④ 4 次免疫の約 1 週間後に、部分採血を行う。40~50ml 程度採血し抗体の生成状態をチェックした後、アフィニティー精製を行う。良好であれば、約 1 ヶ月休

ませて、2 回ほど追加免疫を行って、全採血を行う。

#### (5) 抗体のアフィニティー精製

- ① アフィニティーゲルを調製する。アフィニティー担体としては Affigel 10 または 15 を用いる。まず、ハプテンペプチド 1~5mg を 4ml の 100mM HEPES バッファー (pH7.5) に溶解する。次に、1~2ml の Affigel をガラスフィルター上で吸引洗浄し (氷冷蒸留水 10ml×2 回)、直ちにペプチド溶液に加える。一昼夜 4℃ で回転攪拌した後、フリーのペプチドを除くために、再度ガラスフィルター上で吸引洗浄する。この場合は、十分量の蒸留水以外に 30%酢酸や 20%エタノールを用いて完全に洗浄し、最後に PBS で平衡化しておく。保存は冷蔵で行う。
- ② 特異的抗体をアフィニティーカラムに吸着させる。アフィニティーゲルをカラムに (内径 5~10mm 程度) に詰め、PBS で洗浄する。非働化血清 10ml を同量の PBS で希釈し、フィルター (0.22 または 0.45  $\mu$ m) を通し、カラムに添加する。透過液を回収し、3~4 回再添加を繰り返す (流速は 1ml/分程度)。さらに、約 50ml の PBS でカラムを洗浄する。
- ③ 抗体を回収する。あらかじめ 0.5ml の 2M トリスバッファー (pH9.5) を入れておいたチューブに、アフィニティーゲルから抗体を溶出させる。溶出は、5ml の 50mM クエン酸バッファー (pH3.0) を 1ml/分程度の速度で添加して行う。次に、溶出液を透析チューブに移し、20%グリセロール含 Na-PBS に対して透析を行う (4℃、一昼夜)。抗体の定量は、280nm の吸収を計測して行う (1mg IgG/ml、 $A_{280}$  = 1.4)。通常、1~10mg の特異的 IgG が回収される。保存は、分注後 -80℃で行う。

### 実施例 2 : ニューレグリンの病態作用機序

#### (方法)

##### (1) 細胞の調製

脳橋核の神経細胞および小脳顆粒細胞を各々 E 1 8 B A L B / C および P 7 マウスから標準法によって調製した。7 DIV (days in vitro) 培養物を、両方の細

胞種におけるPMA及び電気刺激のために使用した。顆粒細胞は、受容体サブユニット発現の定量のために、10 mMのKCl条件下インビトロで1～21日間培養した。脳橋核ニューロンは、10%馬血清を含むDMEM (Gibco BRL) で1又は2日間培養し、その後、B-27 (Gibco BRL) を補充したNeurobasal 培地 (Gibco BRL) で維持した。培養物には、B-27 (Gibco BRL) を補充したNeurobasal 培地 (Gibco BRL) から成る培地を供給した。GFPタグ及びベクターを含む全長のNRGプラスミド (pEGFP, Clontech) をLipofectamine (登録商標) 2000 (Gibco BRL) により各々トランスフェクションした (脳橋核のトランスフェクション効率; 1～3%、顆粒細胞; 5～10%)。トランスフェクションの24～36時間後にニューロンを1  $\mu$ MのPMA (Tocris) で60分間刺激した。

## (2) 切断型のNRGの検出

本実施例における電気刺激は、本明細書中上記した構造を有し、図1から5に示した構造を有する細胞刺激装置を用いて行った。

組み換え全長mNRGをトランスフェクションした $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞に30分間の電気刺激 (1 mA、30～60 V細胞外) を加えた後、細胞から得られた条件培地を回収し、セントリコン10及び100 (Millipore) を用いて濃縮し、大分子量 (> 100 kD) 及び小分子量 (< 10 kD) のタンパク質を除去した。7 DIVの顆粒細胞は、脳橋核ニューロン及び顆粒細胞から得た濃縮条件培地で処理した。ErbB リン酸化において、ポリクローナル抗-ErbB4 抗体 (Santa Cruz) による免疫沈降後に、マウスモノクローナル抗ホスホチロシン抗体 (4G10) を用いて標準法によりウエスタンブロット分析を行った (Rieff HI 他 J Neurosci, 19(24), 10757-10766(1999))。免疫沈降試験のために、ライセートを免疫沈降抗体の適当な希釈物と一緒に4℃で1時間インキュベートした後、プロテインA-Sepharose と一緒に4℃で1時間インキュベートした。次いで、ライセートを15000 rpmで3分間遠心し、上清を廃棄した。ペレットを溶解緩衝液で2回洗浄し、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。試料を3分間煮沸し、タンパク質を電気泳動で分離した。

CREBリン酸化を検出するために、7DIVの培養顆粒細胞を、条件培地で1.0～15分間刺激した後、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定化し、ポリクローナル抗-NRGβ1抗体、ポリクローナル抗-PCREB抗体(BioLabs)で染色した。染色した顆粒細胞をレーザー共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)で観察した。Alexa(登録商標)染料(Molecular probe)を二次抗体として使用した。

#### (結果)

#### (1) 脳橋核ニューロン及び小脳顆粒細胞におけるNRGの膜貫通型のタンパク質分断

図6Aの実験で使用した小脳顆粒細胞及び脳橋核ニューロンの分散初代培養物の状態を調べた。脳橋核ニューロン(PN)は、18日目の胚(E18)から調製し、小脳顆粒細胞(GC)は出生後7日目(P7)から調製した。培養ニューロンでのmNRGのタンパク質分断の有無を調べるために、抗ErbB及び抗ホスホチロシン抗体による免疫沈降、及び抗PCREB抗体を用いた免疫細胞化学分析を、GFP-tagを含む組み換え全長NRGβ1をトランスフェクションした場合としない場合について、PKC活性化因子であるホルボール-12-ミリステート-13-アセテート(PMA)で60分間刺激した脳橋核ニューロン及び顆粒細胞を用いて行った。

苔状線維と顆粒細胞の間のシナプスにおけるNRG受容体に関連して、ErbB2及びErbB4が小脳系に関与していることは既報である(Ozaki M 他 Nature, 390, 691-694(1997); 及び Ozaki M 他 Neurosci Res, 30 (4), 351-354(1998))。ErbB4の発現は、小脳顆粒細胞ではインビトロ及びインビボでErbB2の発現よりも強かった。サイクリックAMP応答部位結合タンパク質(CREB)のリン酸化が、ErbB4シグナル伝達経路のさらに下流に関与していた(Taberbero A 他 Mol Cell Neurosci, 10, 309-322(1998))。PMAで処理後の脳橋核ニューロン及び顆粒細胞の培養物の条件培地を回収し、濃縮し、顆粒細胞に5～10分間適用した。抗ErbB4抗体による免疫沈降後に、顆粒細胞からのライセートをSDS-PAGEで解析し、プロットを抗-ホスホチロシン抗体(抗-TYK)で検出した。トランスフェクシ



ンしない脳橋核ニューロン (None)、ベクターをトランスフェクションした脳橋核 (v PN)、NRGをトランスフェクションした脳橋核ニューロン (t PN)、ベクターをトランスフェクションした顆粒細胞 (v GC)、及びmNRGをトランスフェクションした顆粒細胞 (t GC) から、条件培地を回収した。mNRGをトランスフェクションした脳橋核ニューロン及び顆粒細胞は共に、トランスフェクションしないニューロン及びベクターのみをトランスフェクションした細胞と比較して、強いリン酸化活性を示した (図 6 B、図 6 C)。上昇した s NRG 量は、顆粒細胞を用いて ErbB リン酸化によって確認した。mNRG をトランスフェクションしたニューロンから得られた条件培地による 180 kD のチロシン-リン酸化バンドは、PMA 刺激を用いた場合に顕著であった (図 6 B)。トランスフェクションした脳橋核ニューロン及び顆粒細胞を PKC 阻害剤である H7 で処理した場合の条件培地では、リン酸化活性は抑制された。内在性 NRG は ErbB リン酸化の顕著な活性を示さなかった。しかし、リコンビナント (組み換え) mNRG を培養ニューロンにトランスフェクトした場合、ErbB4 リン酸化は顕著であった。これらの結果は、PKC 活性化後に s NRG が組み換え mNRG から産生したことを示す。図 6 C において、リン酸化の比率は、ErbB4 抗体による免疫沈降後にプロットした ErbB4 シグナルに対して標準化した。

CREB-リン酸化の結果を図 6 の D に示す。PMA 刺激 (60 分間) により放出される可溶型をスピンカラムを用いて濃縮し、培養顆粒細胞に添加した。刺激した顆粒細胞を固定後、抗ホスホ CREB 抗体で染色した。脳橋核ニューロンからの条件培地を刺激 (a、b 及び c) のために使用し、顆粒細胞培養物からの条件培地を刺激 (d、e 及び f) のために使用した。パネル D は、コントロール (a、d)、ベクター (b、e) 及び全長 NRG (c、f) を示す。条件培地 (c 及び f) は、切断された内在性及び組み換えの NRG を有するはずである。c から b の引き算及び f から e の引き算は、組み換え mNRG 由来の s NRG により誘発される CREB リン酸化を示す。条件培地による 5 分以上の処理後に、異なる CREB リン酸化が観察された。生培養顆粒細胞を使用した場合には、KC1 刺激による NRG

の放出は明白には観察されなかった。

全長mNRGをトランスフェクションした脳橋核ニューロン及び顆粒細胞からの条件培地は、ErbB-及び CREB-リン酸化の異なる活性を示した。ErbB-及び CREB-リン酸化活性の測定から、タンパク質分断に必要なアミノ酸配列を同定した。図6E及び6Fに示す通り、ELYQKRVL T領域内の欠失変異体は、タンパク質分断を明白には示さなかった。この領域内のKからGへの点変異は表、図6Fに示す通り切断の減少を生じた。NRGはメタロプロテアーゼ (ADAMs) ファミリープロテアーゼの基質として報告されている (Shirakabe K 他 J Biol Chem, 276(12), 9352-9358 (2000))。メタロプロテアーゼによるNRG切断は、主としてゴルジ体で起こると報告されている。mNRGのある種のタンパク質分断は細胞表面で起こることが報告されている (Loeb JA 他 Mol Cell Neurosci, 11(1-2), 77-91 (1998))。NRGのタンパク質分断は、細胞の種類、NRG及びプロテアーゼのタンパク質局在、及び時期に依存して複数のプロテアーゼによって調節されている可能性がある。

## (2) パターン化電気刺激によるNRGのタンパク質分断

CREB-リン酸化活性を、抗-PCREB 抗体を用いた免疫細胞化学分析により測定し、電気刺激による小脳顆粒細胞の CREB リン酸化の最適条件を調べた。顆粒細胞を異なる周波数で5分間電氣的に直接刺激した (図7のA及びB)。1 Hz から 100 Hz の周波数でリン酸化活性が検出され、50 Hz が最適であった。50 Hz での CREB-リン酸化活性は、ナトリウムチャンネルブロッカーTTXで36.6 ± 5.45%ブロックされた。図Bにおいて、PCREB-陽性細胞を計測し、全細胞数に対して標準化した。これらの実験は、異なる周波数によりニューロン細胞内に異なる状況が生じることを示唆する。NRGのタンパク質分断に最適な周波数は50 Hzであった。

NRGのタンパク質分断が異なるパターンの電気刺激で生じるかどうかを確かめるために、異なる周波数での電気刺激後に、ErbB リン酸化を抗-TYK 及び抗-ErbB4 抗体を用いた免疫沈降により検出した。GC 及び PNN 培養物を、刺激装置に

パラレルに接続したマルチ白金電極を装着した35mm皿中で電氣的に刺激した。電気刺激は、定常電流で30秒間、0.1~100Hzで連続的に送られる0.2msecの矩形パルスの交流(1mA)で行なった。十分に切断された形のNRGを入手するために、ニューロンを異なる周波数で30分間刺激した。各々の刺激により、刺激されたニューロンには、異なる定常状態のカルシウムレベルが付与される。高周波数は高い定常状態のカルシウムレベルを示す。刺激中の培地のpH及び温度は、刺激しない場合と同じであった。

抗-ErbB4抗体で落とした切断型NRGは、抗TYK抗体を用いた免疫ブロットにより検出した。リン酸化の効率は、ErbB4シグナルに対して標準化することにより測定した。リン酸化シグナルは、他の周波数の場合と比較して50Hzの刺激で有意に強かった(図8A及び図8B)。条件培地のCREB-リン酸化活性も50Hzの刺激が最適であった(図8C及び図8D)。さらに、PNNからの条件培地もCREBリン酸化においてGCと同様の傾向を示した。50Hzの刺激で、 $77.4 \pm 2.08\%$ のGCはPCREB陽性であり、100Hzの刺激では、 $62.5 \pm 4.17\%$ のGCがPCREB陽性である。PCREBの反応ピークは50Hzで観察された( $n=15$ 、コントロールに対して $P<0.00018$ 、t検定)。50Hzの刺激によるCREBリン酸化はH7により阻害された( $n=7$ 、50Hz刺激に対して $P=0.003$ )。非切断型のNRG(欠失変異体)を顆粒細胞にトランスフェクションし、細胞を50Hzで刺激した場合、pCREBの数は有意に減少した( $n=5$ 、50Hz刺激に対して $P=0.005$ )。

上記方法を使用後、図8E~Gに記載した方法を使用して切断型のNRGを検出した。実施例1で作製した切断型ニューレグリンのC末端のみを認識する抗体(抗sNRG抗体)を使用した。電気刺激後、約 $5 \times 10^7$ 個のトランスフェクションした顆粒細胞を使用して条件培地を回収した。100kD以上及び10kD未満のタンパク質をセントリコン10及び100遠心濾過を用いて除去し、セントリコン10によりさらに濃縮した。その後、抗sNRG抗体を用いて免疫沈降を行い、NRGの $\beta 1$ アイソフォームのみを認識できる抗-NRG $\beta 1$ 抗体を

用いてイムノプロットした。プロットを図8Gに示す。切断したNRGのシグナルは約30～40kDの位置に検出された。H7で50Hzの刺激の場合、切断型のNRGのシグナルは明白には検出されなかった。以上の結果から、sNRGは、特定のパターンの電気刺激により開始かつ制御されたタンパク質分断によりmNRGから産生することが判明した。

### 実施例3：伝達受容体発現機構の解析

(方法) NMDA及びGABA受容体サブユニットのリアルタイム定量分析

電気刺激後、リアルタイム定量分析 (ABI prism 7700, Perkin Elmer) を行った。Primer Express (PE Biosystems) を用いてプライマー及びTaqManプローブを設計した。各プライマーにより増幅したPCR産物はアガロースゲル上でシングルバンドであった。産物を直接配列によって確認した。使用した全プライマーは他の遺伝子と交差しなかった。薬理実験では、TTX (1  $\mu$ M, Tocris)、D-AP5 (50  $\mu$ M, Tocris)、MK801 (25  $\mu$ M, Tocris)、CNQX (10  $\mu$ M, Tocris)、Cd (100  $\mu$ M, Wako Inc.) 及びEGTA (1 mM, Sigma) を使用した。

(結果) 電気刺激により制御されたNMDA及びGABA受容体サブユニットの発現

NMDA及びGABA受容体サブユニット発現を制御できる電気活性のパターンを調べた。リアルタイム定量化ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて、NMDA及びGABA受容体サブユニットのmRNAの発現を、インビトロで1～21日目の培養中で定量した。まず、培養顆粒細胞中のNMDA及びGABA受容体の各サブユニットのmRNA発現レベルを調べた (図9A)。ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) を対照として用いた。P7マウスから調製した7DIV (days in vitro) 培養ニューロンの性質は、成熟期でインビボでP14マウスのものと理論的に同一である。インビボのP14で、NR2B発現は小脳顆粒細胞でシャットダウンする一方、NR2C発現は全顆粒細胞で見られる。NM

DA受容体のサブユニットの切り替えはマウスではP14でほぼ終了した。一方、GABAAの $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 及び $\gamma 2$ サブユニットはインビボのP14で大量発現していた。インビトロの状況をインビボに適合するように調整するために、インビトロで7日間培養した顆粒細胞を選択して電気刺激した。

培養顆粒細胞を異なる周波数(0~100Hz)で1mAで30分間刺激した(図9B、9C)。刺激後の細胞の生物学的活性は化学染色及び抗NRG抗体染色によって確認したが、生細胞数の有意な差異は何れの場合も見られなかった。NMDA受容体NR2B及びGABAA $\alpha 2$ 、 $\gamma 1$ の場合、電気刺激の効果は何れの周波数でも明白には検出されなかった。NMDA受容体NR2Cサブユニットの発現は、1Hz及び100Hzの周波数での直接刺激によって促進され、100Hzなどの高周波数での刺激で検出された増加はTTXによりブロックされた。

1Hzの刺激によるNR2Cの増加は、TTXにより強くはブロックされなかった。GABAA受容体 $\beta 2$ サブユニットの場合、mRNA発現は、0.1から10Hzの低周波数の刺激で増加した。低周波数の刺激による増加はTTXにより部分的にブロックされたが、100Hzによる $\beta 2$ の増加はTTXによりブロックされなかった。

薬理学的実験によれば、NMDA及びAMPA受容体活性、並びにカルシウムチャンネルがNR2C及び $\beta 2$ 発現の保持に関与していることが示された。1Hzで刺激したNR2Cでは、mRNAの発現はNMDA、AMPA受容体アンタゴニストにより強く阻害された。刺激周波数100Hzでは、特にMK801(非競合NMDA受容体アンタゴニスト)がNR2C増加を強くブロックした。また、カルシウムチャンネルは、AMPA受容体よりもNR2C発現に寄与していた。

1Hzで刺激した $\beta 2$ では、刺激周波数1HzのNR2Cの場合と同様の結果であった。100Hzで刺激した $\beta 2$ のmRNAの増加は、NMDA、AMPA受容体アンタゴニスト及びカルシウムチャンネルブロッカー(非特異的ブロッカー; Cd & EGTA)により阻害された。NR2C及び $\beta 2$ の両方の場合で、カルシウムチャンネルブロッカーは高周波数でサブユニットの発現を強く阻害した

が、低周波数では阻害しなかった。異なる周波数は、関与する顆粒細胞受容体の組み合わせと活性の度合いを制御していることがわかる。また、特定の電気刺激は、アンタゴニスト及びブロッカーの存在下でも正常な活性を部分的に回復することができた。1 Hz の刺激でカルシウムチャンネルブロッカーを用いた場合の例を示す（図 9 C、 $\beta 2$  の場合）。

### （C）考察

#### （実施例の考察）

図 10 に示す通り、小脳顆粒細胞は、NMDA 及び GABA<sub>A</sub> 受容体を介して苔状線維及びゴルジ細胞からの興奮性及び抑制性シグナルの入力のバランスを取っていると考えられる。顆粒細胞のニューロン発火のパターンは、各種受容体の関与によってシナプス発達中に変化する。顆粒細胞における最終的神経活動のパターンは、伝達物質、神経ペプチド、及び神経栄養因子、並びに、シナプス前部ニューロンを含む環境刺激からの他のものなどの分子の組み合わせによって決まる可能性が高い。分子の異なる組み合わせは、分子の挙動と電気活性のパターンの関係において、異なるパターンのニューロン発火をもたらすはずである。幾つかの遺伝子発現がパターン化された電気活性によって調節されていることは既報である（Buonanno A 他 Curr Opin Neurobiol, 9, 110-120 (1999)）。パターン化された電気活性によって分子のリン酸化活性が制御されていることは確かである（Buonanno A 他 Curr Opin Neurobiol, 9, 110-120 (1999)）。

実施例 2 では、タンパク質分断などのタンパク質プロセッシングが、パターン化された電気活性によって制御されることを実証した。NRG のタンパク質分断は低周波数から高周波数で検出されたが、シナプス前細胞である苔状線維とシナプス後細胞である顆粒細胞からの NRG のタンパク質分断に最適な刺激周波数は共に 50 Hz であった。この現象は、分子的観点から、シナプス前後細胞間で神経活動のパターンが同調する機構を裏付けている。シナプス前部シグナルは先ずシナプス後部ニューロンを活性化し、次に、シナプス前部及びシナプス後部ニュー

ロンを同調させる。シナプス後部細胞がシナプス前部細胞と同調する際に、シナプス後部ニューロンはオートクライン機構で自己活性化し、第 III 期に入る可能性がある (図 10)。シナプス形成過程において、シナプス前部ニューロンからのシグナルや逆行性シグナル伝達を介した分子情報の交換の後に、mNRG は刺激依存型のタンパク質分断を受ける可能性もある。何れの場合も、50 Hz の刺激はシナプス前部及びシナプス後部のニューロンの間の伝達における中間段階と考えられる (図 10 の I I)。

さらに、sNRG により調節される NR2C 及び  $\beta 2$  発現の分子機構が明らかになった。低周波数の刺激では (1 Hz)、 $\beta 2$  RNA はグルタミン酸受容体及び ErbB 受容体の活性化を介して、NR2C RNA よりも多量に転写された。NR2C mRNA は、高周波数 (100 Hz) では  $\beta 2$  よりも強く誘導され、グルタミン酸受容体 (特に、NMDA 受容体) の活性化を伴った。NRG のタンパク質分断の最適周波数である 50 Hz では、NR2C 及び  $\beta 2$  サブユニット発現は観察できなかった。NR2C 発現にはニューロン活動が必要であり、可溶型の NRG の産生効率 は電気活動によって制御されている可能性は既に提唱されている (Ozaki M 他 The Neuroscientist, 7(2), 146-154(2001))。本実施例では、NRG のタンパク質分断が周波数に依存した形で電気活動のパターンによって制御されていることを初めて実証した。NRG は NR2C 及び  $\beta 2$  サブユニット発現を誘導するのに必要であるけれども、発現段階 (図 10 の I 及び III) 及び中間段階 (図 10 の II) の間で周波数の最適値に不一致が生じた。この不一致を説明するために、薬理学的実験を行った。この薬理学的実験の結果から、ErbB 受容体を含む複数の受容体が NR2C 及び  $\beta 2$  サブユニット発現の制御に関与していることが判明した。

直接的電気刺激実験から、以下の 2 つの事項が示唆される。(1) 遺伝子発現を誘導するために必要な受容体の活性化には、細胞自身のもつ神経活動が必要な場合があり、(2) 直接的電気刺激は、受容体及びイオンチャネルブロッカーの効果の一部を部分的に補うことができる (図 9、C)。シナプス成熟の過程において、特定

のパターンのニューロン活性と受容体活性化の間にカスケードが存在する可能性がある（図11）。受容体Aが活性化される場合、ニューロンはパターンAの神経活動を有する。次に、受容体BがパターンAによって活性化され、パターンBが産生する。その結果、ニューロンはパターンAとBをあわせた活動パターンを有する。カスケードにおける各パターンの活動が分子挙動を制御する可能性がある。特定のパターンが分子挙動を制御し、ニューロン発火のパターンが、個々の受容体又はチャンネルの活性化の組み合わせによって構成されていると考えられる。構成された各パターン内に遺伝子発現リン酸化タンパク質のプロセッシングなどの分子の挙動を制御する一定の過程が存在するはずである。従って、活性化した受容体及びイオンチャンネルの組み合わせ及びそれらの活性化の順序が、上記した不一致を解くための鍵を握っている可能性がある。

さらに、アンタゴニスト及びブロッカーによりブロック可能な受容体の幾つかの作用は、特定の電気刺激によって補うことができた。これは、シナプス前部ニューロン、受容体及びチャンネル活性の役割がある特定パターンの電気活性によって模倣できることを意味する。従って、ニューロン形成を人工的に制御する電気活性のパターンの役割を調べることは重要である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、電氣的刺激が直接細胞に及ぼされないから、細胞へのダメージが小さく、また多数の細胞に一度に電氣的刺激を与えることができる。また細胞が電流の流れる通路に置かれるようになるため、細胞の電氣的刺激を短時間で効率的に行えるようになる。即ち、本発明によれば、生体外で効率よく大量の神経細胞に、細胞を傷つけることなく、直接電気刺激を与えることができる。



## 請求の範囲

1. 培養細胞を入れるための培養容器の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、細胞刺激装置。
2. 培養細胞を入れるための培養容器の上面又は側面の一方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち一方の第一の電極と、前記培養容器の上面又は側面の他方から前記培養細胞に接触しないか、細胞表面に接触する距離まで延びる正または負のうち他方の第二の電極とを備え、前記第一の電極と前記第二の電極とにより細胞を刺激する電場を形成することを特徴とする、請求項 1 に記載の細胞刺激装置。
3. 前記第一の電極が円形のリング電極である、請求項 1 又は 2 に記載の細胞刺激装置。
4. 前記第二の電極が一本の点電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。
5. 前記第二の電極が複数の多点電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。
6. 前記第二の電極がメッシュ状のシート状電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。
7. 前記第二の電極が多点電極を含むシート状電極である、請求項 1 から 3 の何れかに記載の細胞刺激装置。
8. 請求項 1 から 7 の何れかに記載の細胞刺激装置を用いて、前記第一の電極と前記第二の電極とにより電場を形成し、該電場により培養細胞を刺激することを特徴とする、細胞の電氣的刺激方法。

9. 培養細胞が神経細胞である、請求項 8 に記載の細胞の電氣的刺激方法。

図 1

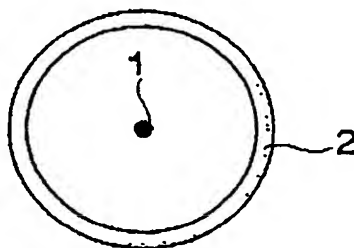
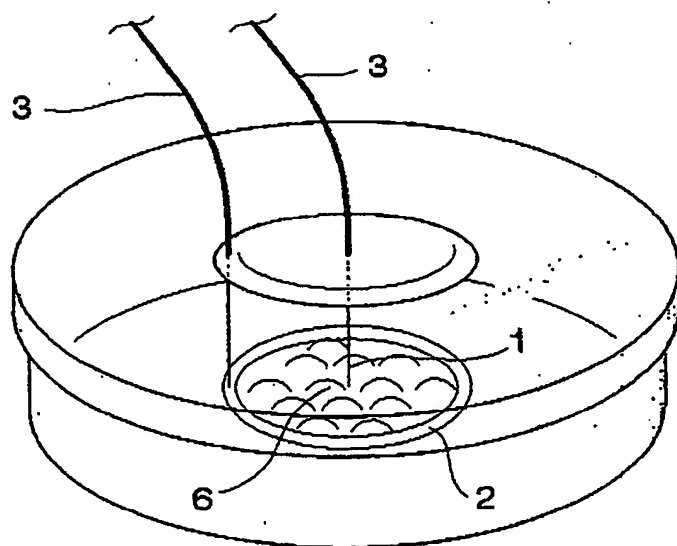
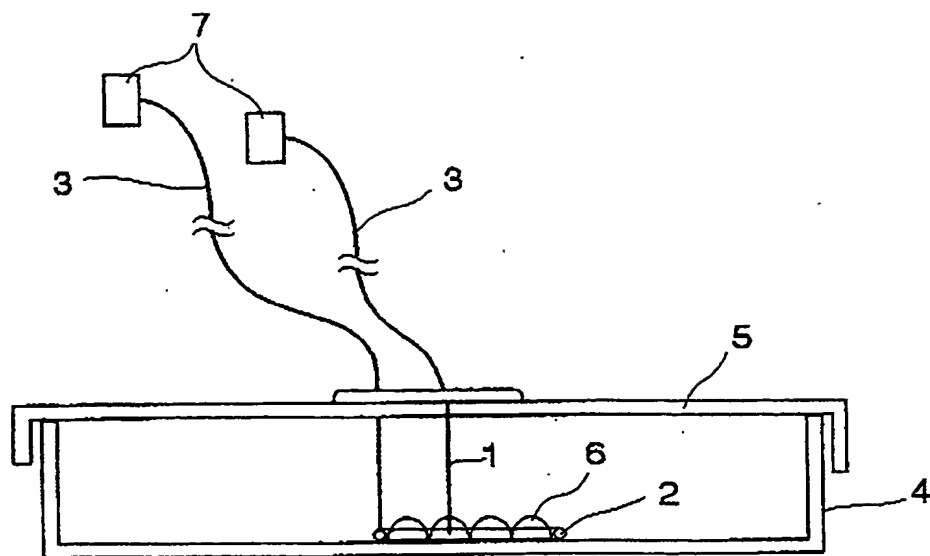


図 2

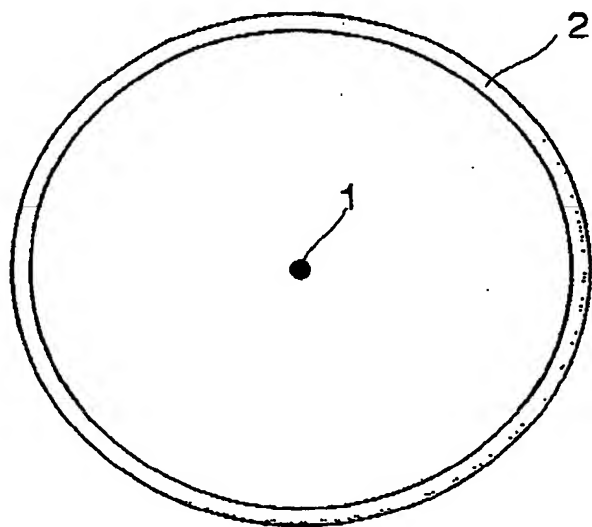
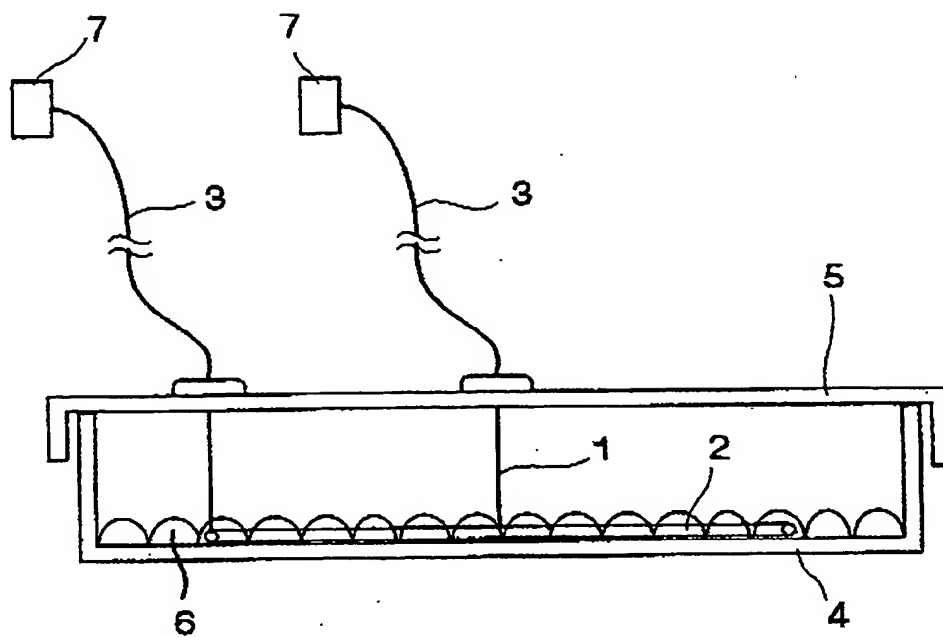


図 3

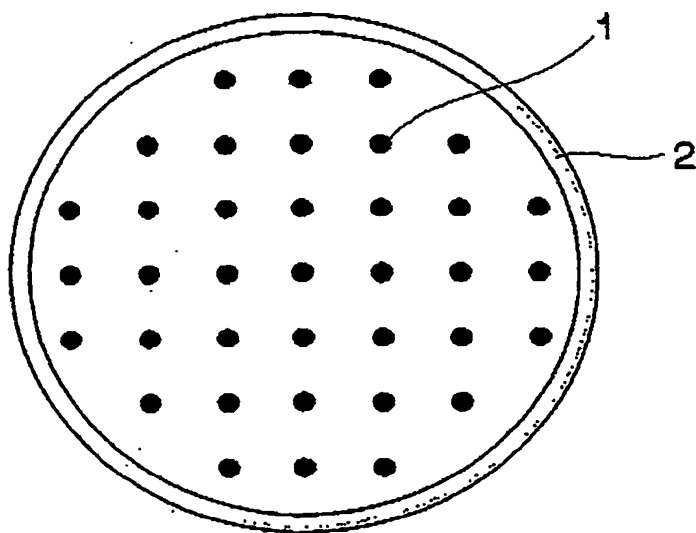
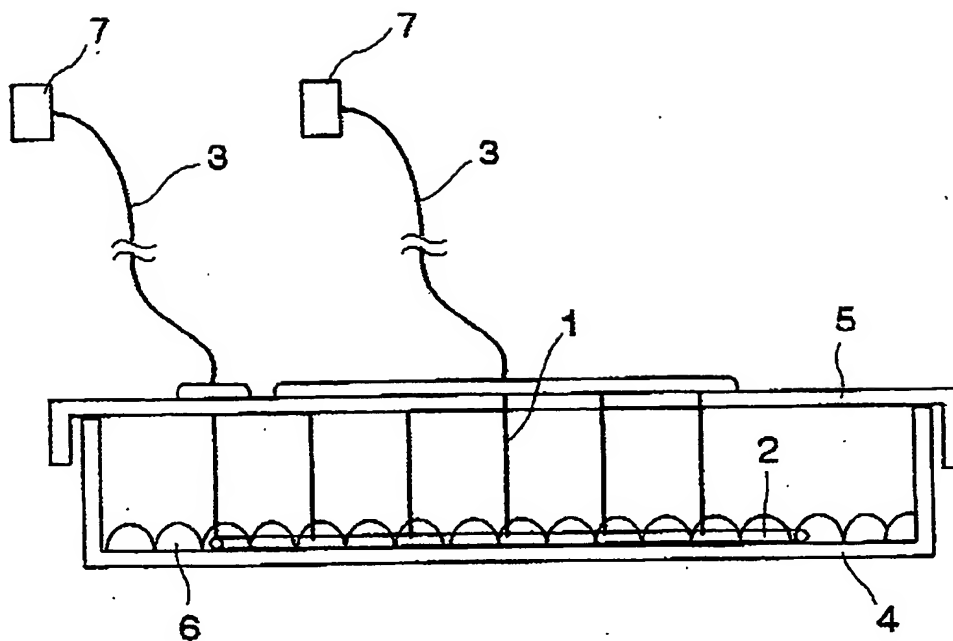


図 4

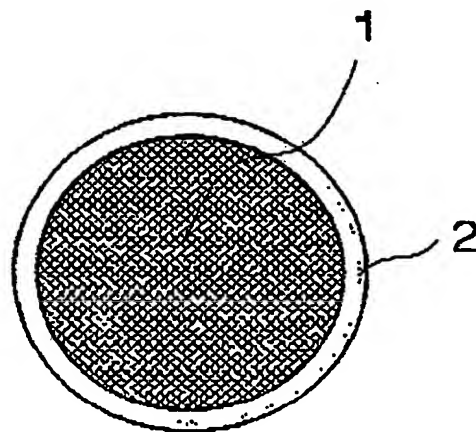
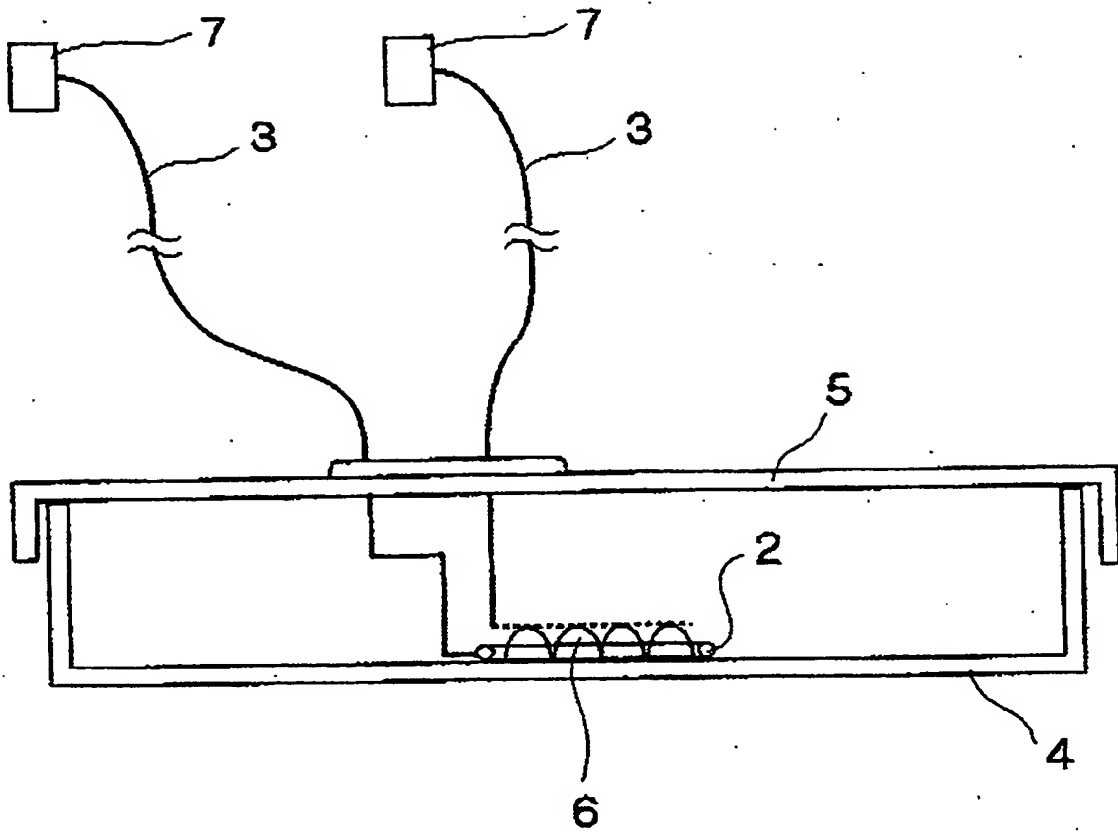


図 5

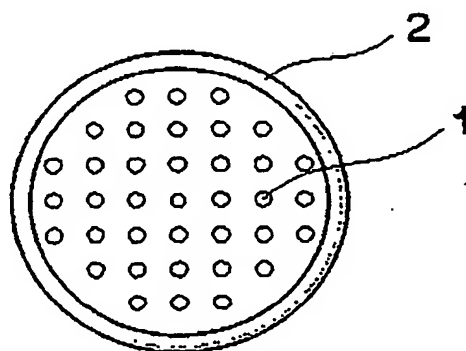
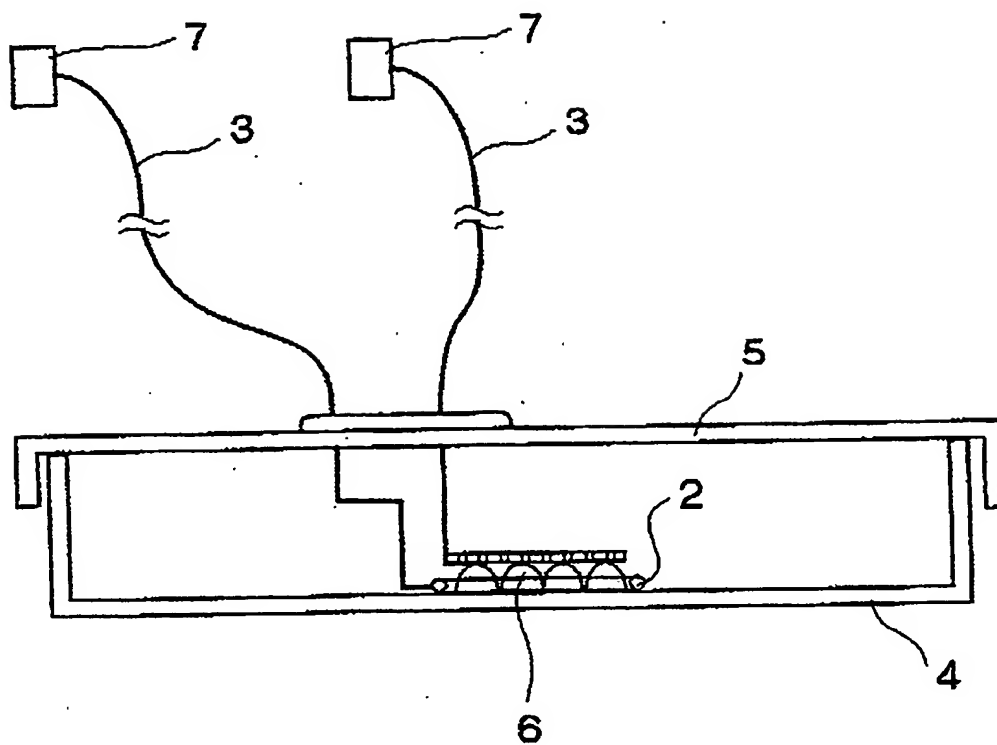


図 6

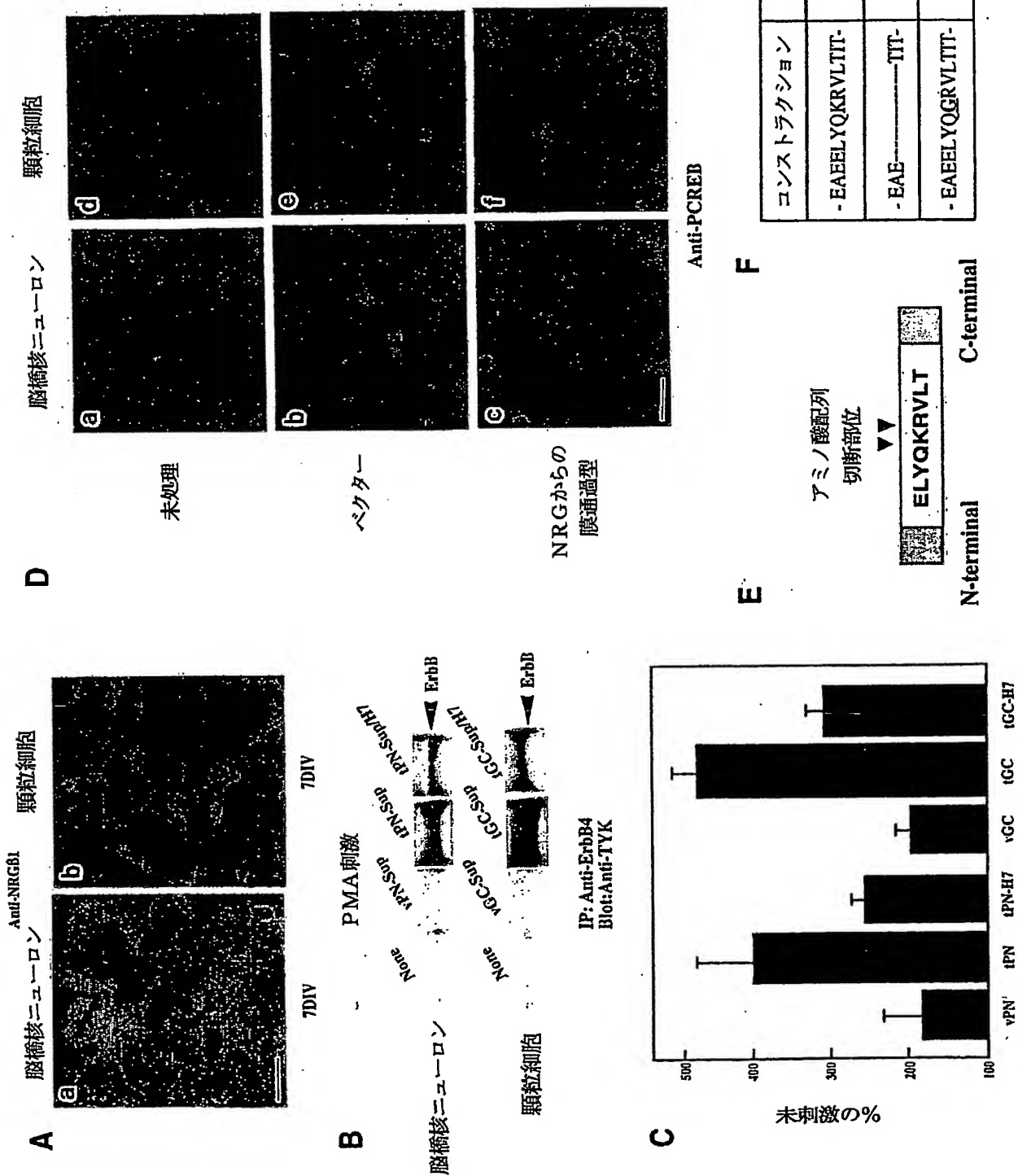




図 7

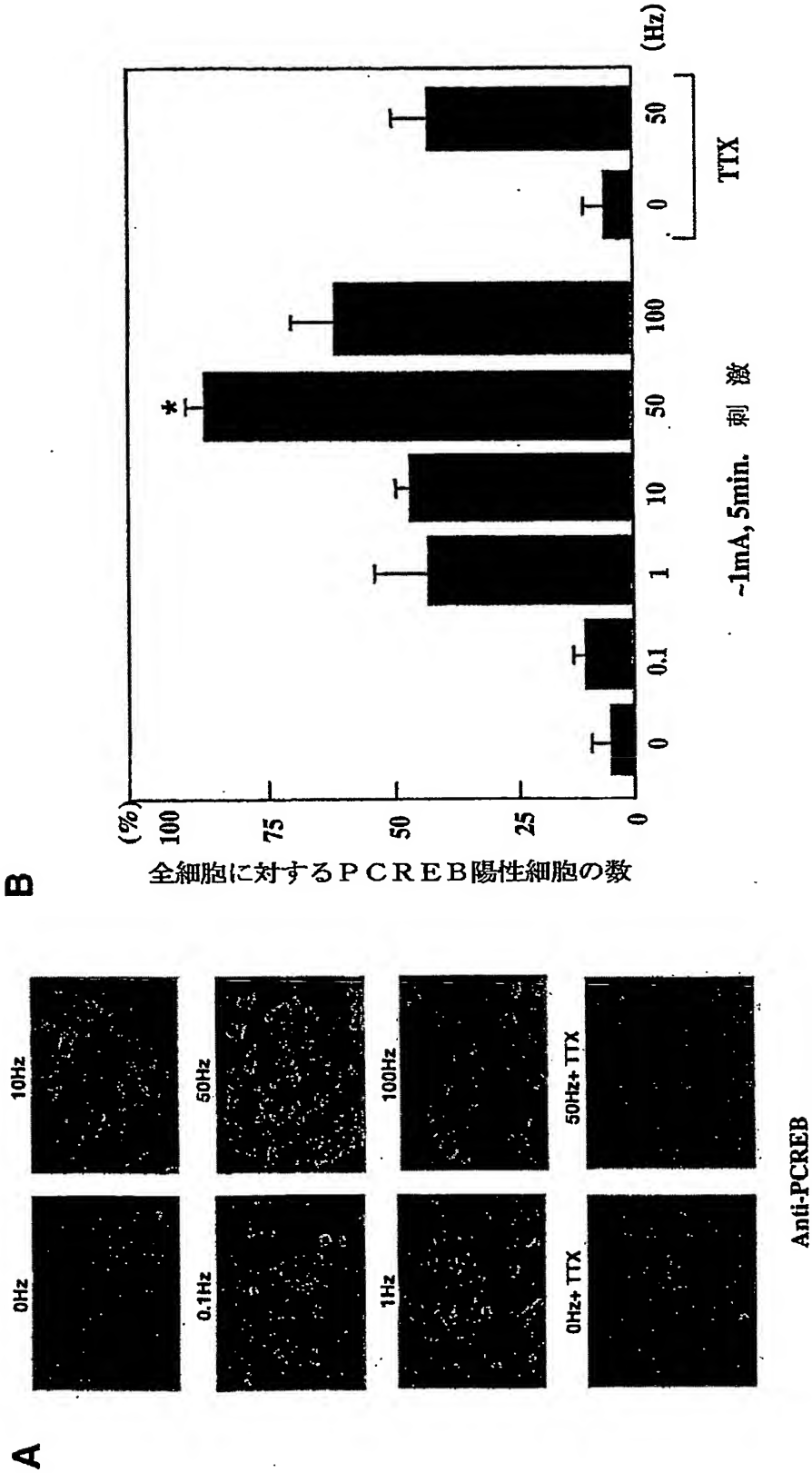
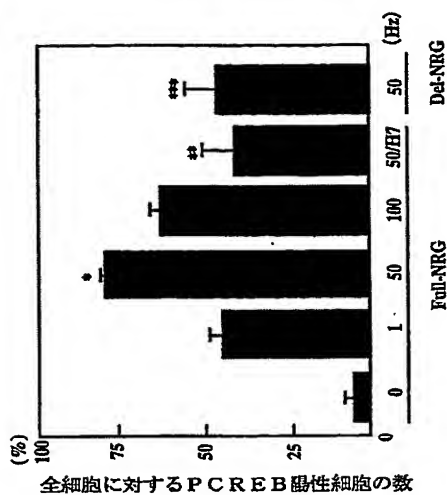


图 8



全細胞に対するPCREB陽性細胞の数

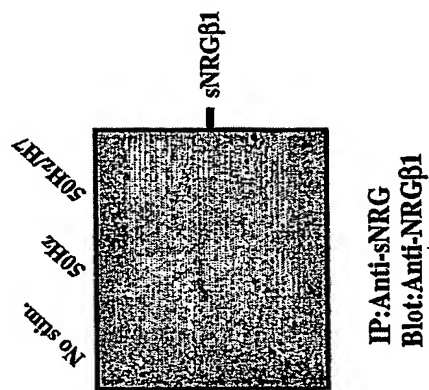
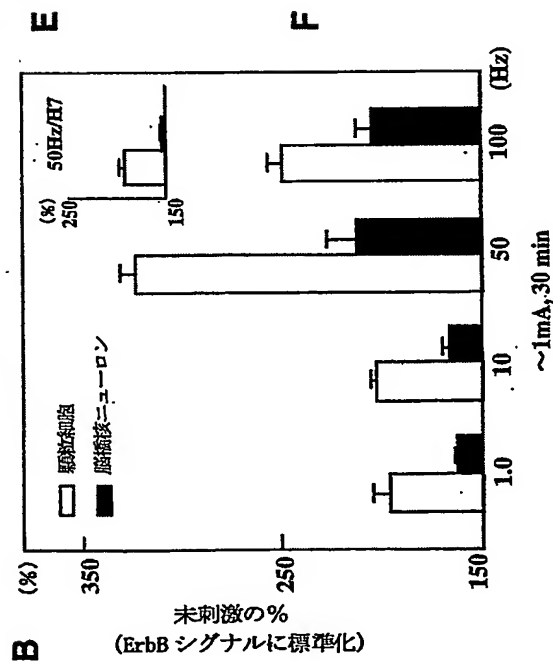
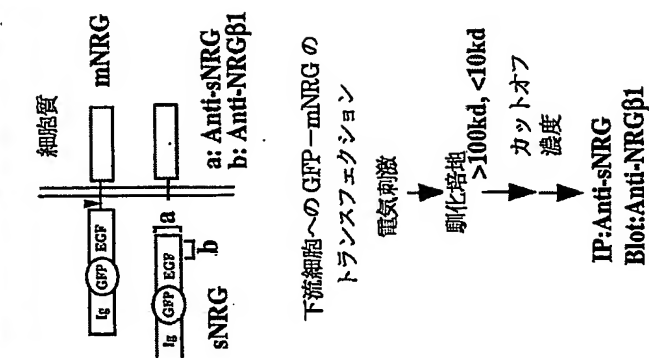
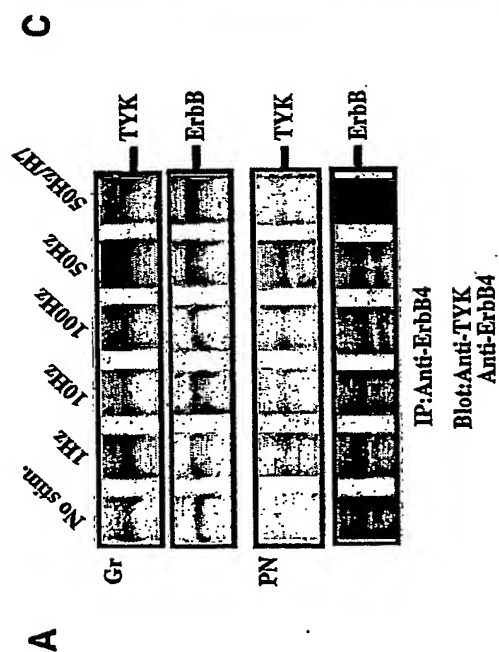
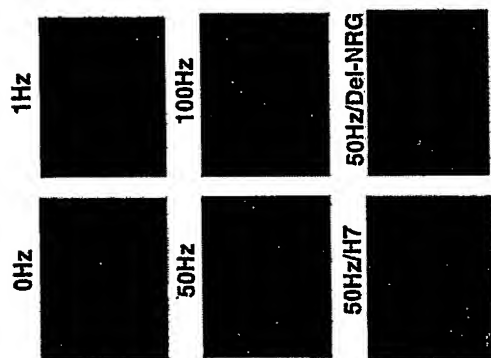
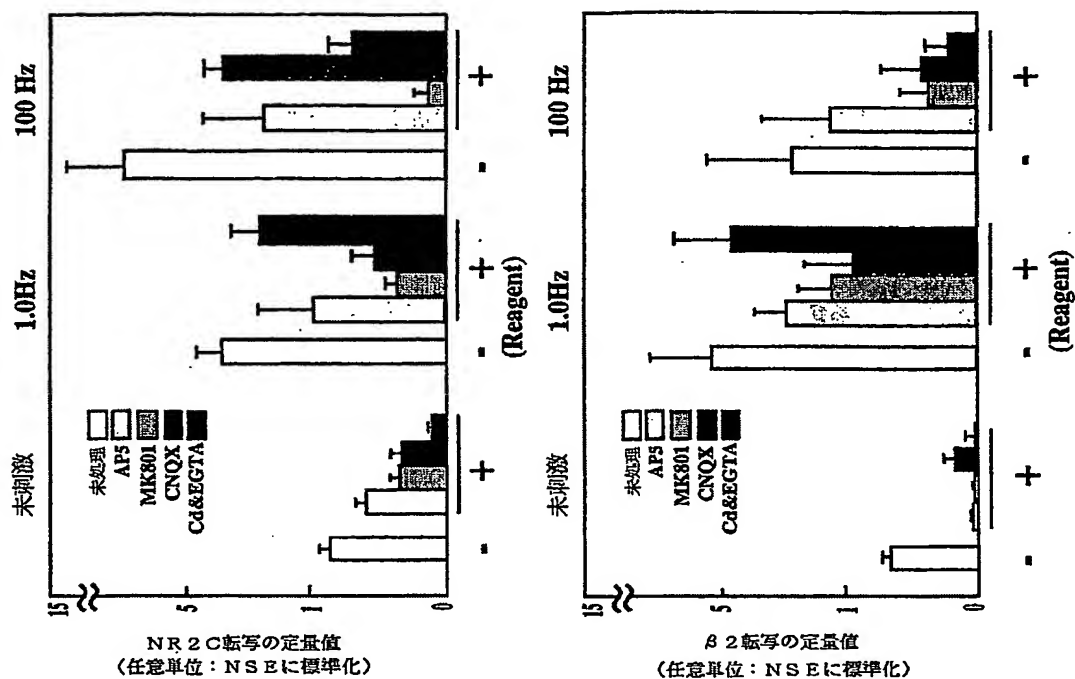
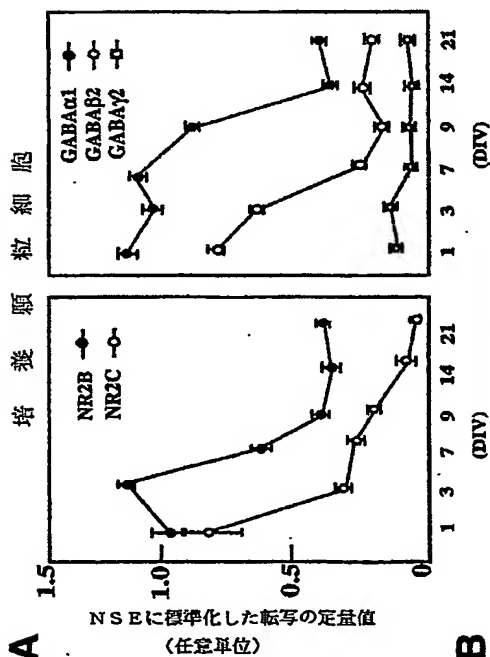


图 9



U



自來

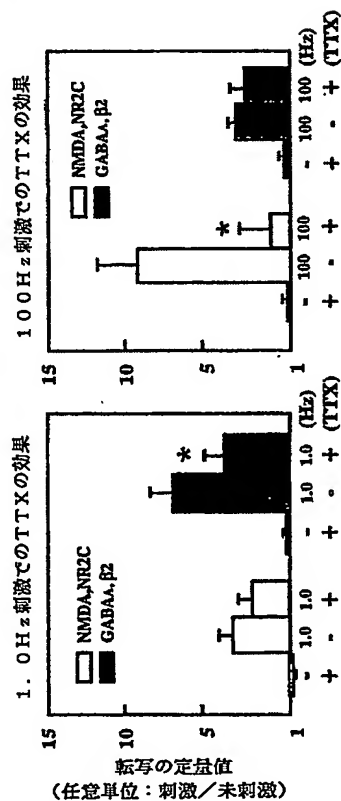
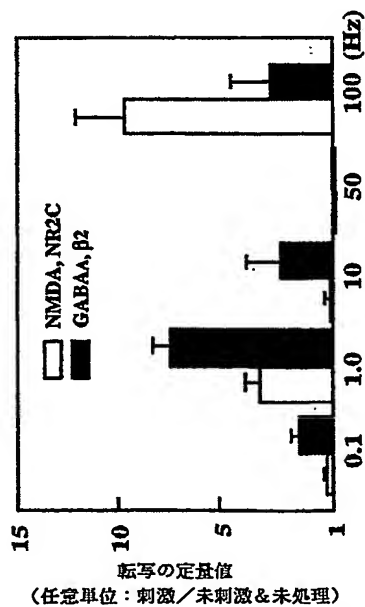


図 10

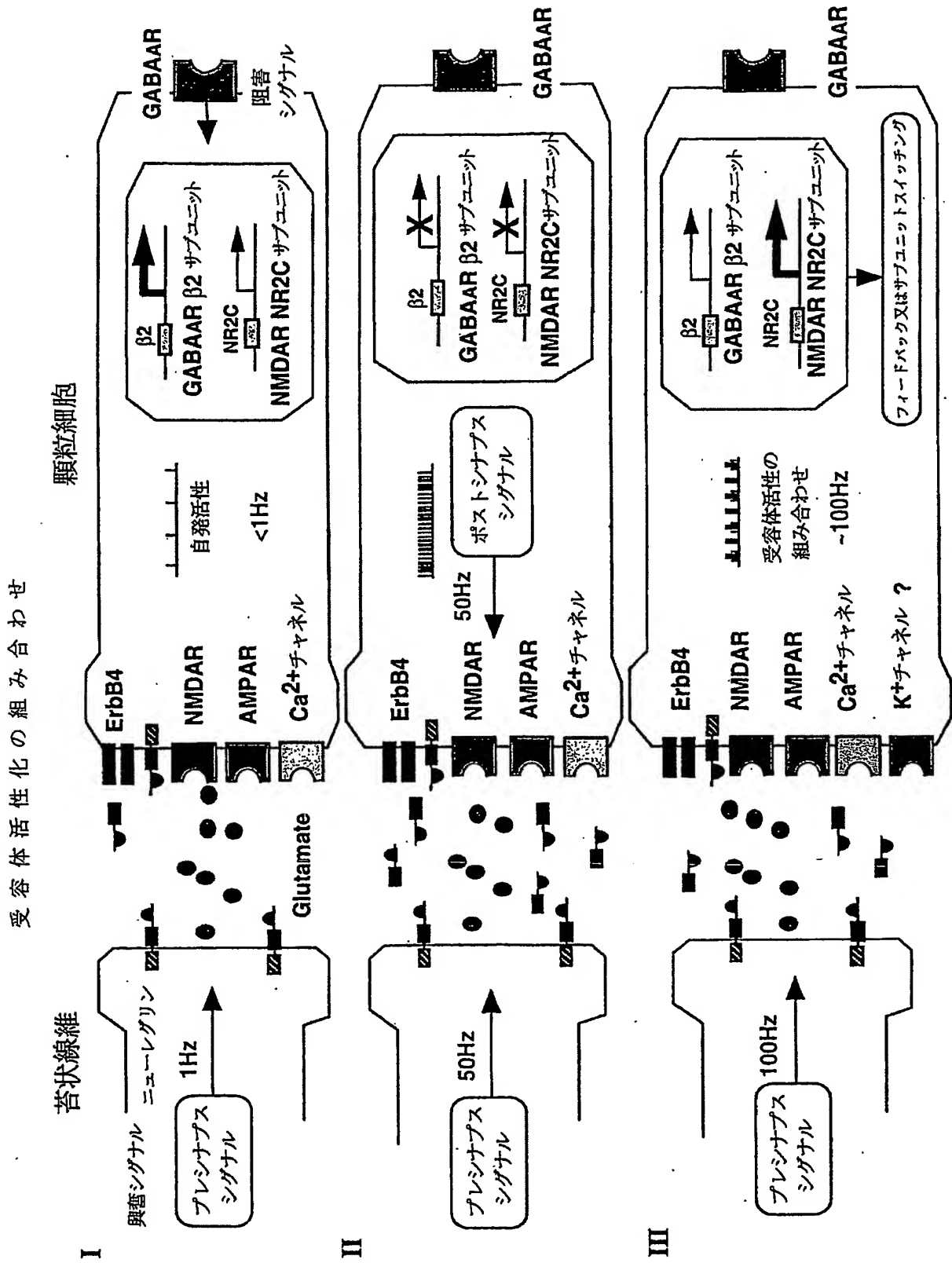
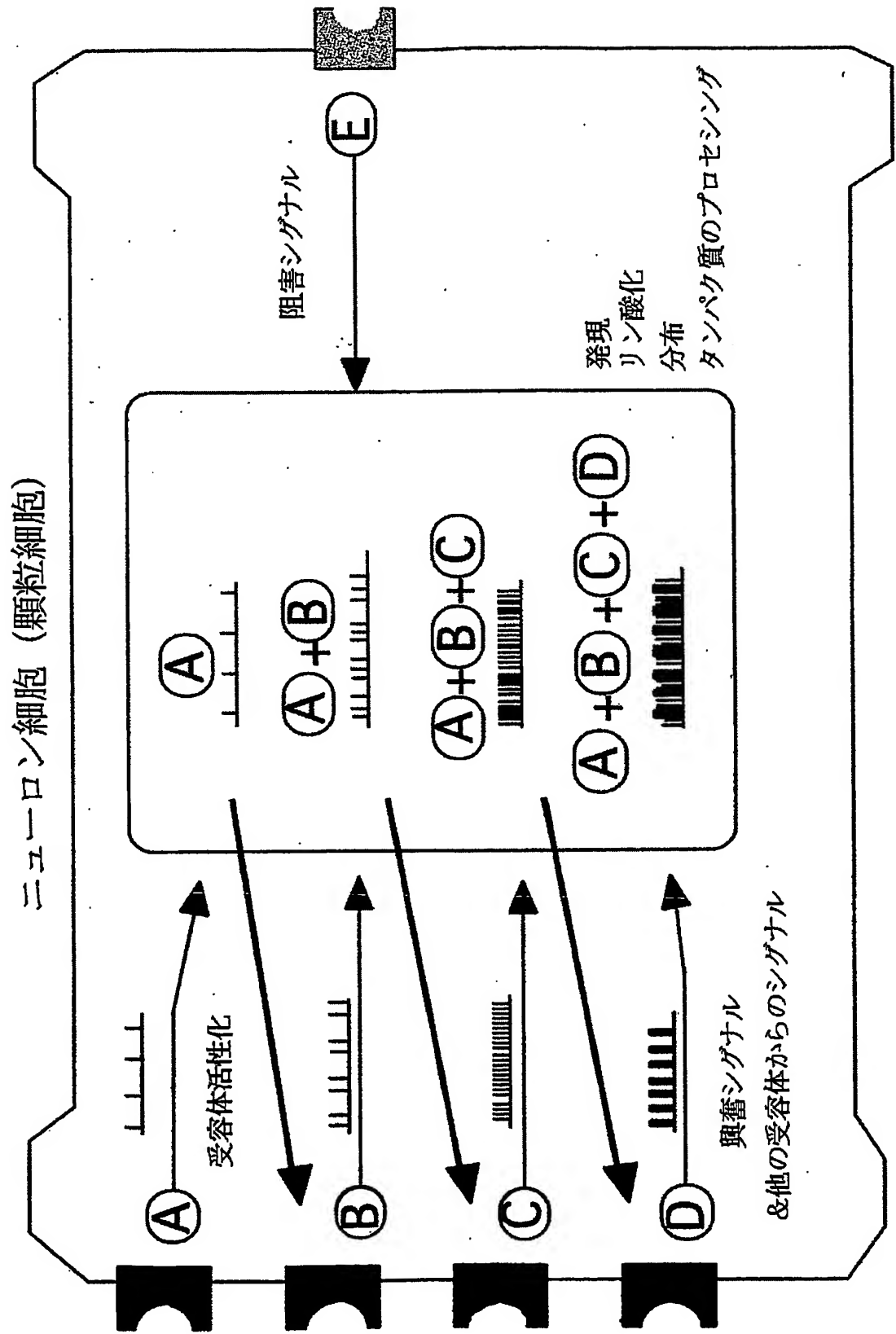


図 11



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A device for cell stimulation and a method for stimulating cells

<130> A41260A

<160> 2

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 1

Cys Glu Glu Leu Tyr Gln

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Synthetic peptide

<400> 2

Cys Glu Leu Tyr Gln Lys

1 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/42, C12N13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/42, C12N13/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-000225 A (Hakuju Institute for Health Science Co., Ltd.), 07 January, 2003 (07.01.03), Claims; Par. Nos. [0016] to [0017], [0020]; Fig. 2 & WO 2003/00838 A1 & EP 1408105 A1	1, 2, 8 3-7, 9
X Y	JP 63-276478 A (Shimadzu Corp.), 14 November, 1988 (14.11.88), Claims; page 1, right column, lines 13 to 16; Figs. 1, 2 (Family: none)	1, 3, 8 3, 9
X Y	JP 62-265976 A (Shimadzu Corp.), 18 November, 1987 (18.11.87), Claims; page 1, right column lines 6 to 10; Figs. 1, 2 (Family: none)	1, 3, 8 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
30 July, 2004 (30.07.04)

Date of mailing of the international search report  
17 August, 2004 (17.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005818

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-350573 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 19 December, 2000 (19.12.00), Par. No. [0009] & WO 2000/77163 A1 & EP 1106681 A1	6
Y	JP 2003-505073 A (The Regents of the University of California), 12 February, 2003 (12.02.03), Par. No. [0043] & WO 2001/07584 A1 & US 2001/0046706 A1 & EP 1196549 A1	4, 5, 7
Y	JP 2001-515343 A (Massachusetts Institute of Technology), 18 September, 2001 (18.09.01), Claims & WO 97/16545 A1 & EP 868708 A1 & US 6095148 A	9
E, X	JP 2004-147517 A (Hitachi, Ltd.), 27 May, 2004 (27.05.04), Claims; page 5, line 47 to page 6, line 19; Figs. 5, 6 (Family: none)	1-9
P, A	JP 2004-089018 A (Japan Science and Technology Corp.), 25 March, 2004 (25.03.04), Claims; Figs. 1, 3, 4 (Family: none)	1-9
P, A	JP 2003-144136 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 20 May, 2003 (20.05.03), & US 2003/0157708 A1 & DE 10252773 A1	1-9
A	WO 2002/55653 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 18 July, 2002 (18.07.02), & US 2003/0113833 A1 & EP 1352952 A1	1-9
A	JP 2002-153260 A (Japan Science and Technology Corp.), 28 May, 2002 (28.05.02), & WO 2002/42411 A1 & EP 1344817 A1 & US 20040067482 A1	1-9



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005818

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl. <sup>7</sup> C12M1/42, C12N13/00			
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C12M1/42, C12N13/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2004年 日本国実用新案登録公報 1996-2004年 日本国登録実用新案公報 1994-2004年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPIDS(STN) JICSTファイル(JOIS)			
<b>C. 関連すると認められる文献</b>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X Y	JP 2003-000225 A (株式会社白寿生科学研究所) 2003. 01. 07, 特許請求の範囲, 【0016】 - 【0017】, 【0020】段落, 図 2 & WO 2003/00838 A1 & EP 1408105 A1	1, 2, 8 3-7, 9	
X Y	JP 63-276478 A (株式会社島津製作所) 1988. 11. 14, 特許請求の範囲, 1 頁右欄 13 - 16 行, 第 1 図, 第 2 図 (ファミリーなし)	1, 3, 8 3, 9	
X Y	JP 62-265976 A (株式会社島津製作所) 1987. 11. 18, 特許請求の範囲, 1 頁右欄 6-10 行, 第 1 図, 第 2 図 (ファミリーなし)	1, 3, 8 3	
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 30. 07. 2004		国際調査報告の発送日 <div style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">17. 8. 2004</div>	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-350573 A (松下電器産業株式会社) 2000. 12. 19, 【0009】 段落 & WO 2000/77163 A1 & EP 1106681 A1	6
Y	JP 2003-505073 A (サ・レジエンツ・オブ・サ・ユニバーシティー・オブ・カリフォルニア) 200 3. 02. 12, 【0043】 段落 & WO 2001/07584 A1 & US 2001/0046706 A1 & EP 1196549 A1	4, 5, 7
Y	JP 2001-515343 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 2001. 09. 18, 特許請求の範囲 & WO 97/16545 A1 & EP 868708 A1 & US 6095148 A	9
EX	JP 2004-147517 A (株式会社日立製作所) 2004. 05. 27, 特許請求の範 囲, 5 頁 4 7 行 - 6 頁 1 9 行, 図 5, 図 6 (ファミリーなし)	1-9
PA	JP 2004-089018 A (科学技術振興事業団) 2004. 03. 25, 特許請求の範囲, 図 1, 図 3, 図 4 (ファミリーなし)	1-9
PA	JP 2003-144136 A (理化学研究所) 2003. 05. 20 & US 2003/0157708 A1 & DE 10252773 A1	1-9
A	WO 2002/55653 A1 (松下電器産業株式会社) 2002. 07. 18 & US 2003/0113833 A1 & EP 1352952 A1	1-9
A	JP 2002-153260 A (科学技術振興事業団) 2002. 05. 28, & WO 2002/42411 A1 & EP 1344817 A1 & US 20040067482 A1	1-9

## 第 I 欄 ニュクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ ☒ 配列表  
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面  
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる  
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見: